

Efeito da associação de antagonistas no controle de *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* em plântulas de citros*

Edna P. da R. Amorim¹, Itamar, S. de Melo²

¹ Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade-Universidade Federal de Alagoas, CEP 05.7075-000, Maceió, AL, Brasil.

² CNPMA/EMBRAPA, CEP 13.820-000, Jaguariúna, SP, Brasil

* Parte da Tese de Doutorado da primeira autora defendida na UNESP, Botucatu, SP.

Aceito para publicação em: 27/04/99.

RESUMO

Amorim, E.P. da R., Melo, I.S. de. Efeito da associação de antagonistas no controle de *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* em plântulas de citros. *Summa Phytopathologica*, v. 25, p. 335-338, 1999.

O efeito da associação de três isolados de *Trichoderma* spp. e sete isolados de rizobactérias sobre estirpes de *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora*, foi avaliado através das variáveis: altura das plântulas, comprimento das raízes, massa da parte aérea e das raízes, número de plantas sobreviventes e nível de infestação do solo. Em casa-de-vegetação, raízes de plântulas de citros foram submetidas aos tratamentos: associação de isolados de *Trichoderma harzianum* e *T. koningii* (AT); suspensão de

isolados de rizobactérias - *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas* fluorescentes (SR); e associação de rizobactérias com isolados de *Trichoderma* (ART). As plântulas foram transplantadas para substrato pré-infestado com isolados de *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora*. Os resultados mostraram que ART controlou as duas espécies de patógenos, enquanto SR foi suficiente para controlar *P. citrophthora*.

ABSTRACT

Amorim, E.P. da R., Melo, I.S. de. The role of antagonist association on the control of *Phytophthora parasitica* and *Phytophthora citrophthora* on seedlings of citros. *Summa Phytopathologica*, v. 25, p. 335-338, 1999.

The role of the association of *Trichoderma spp.* isolates and seven rhizobacteria isolates on *Phytophthora parasitica* and *P. citrophthora* was tested. The following variables were evaluated: seedlings height, root length, shoot and root dry weight, number of survival plants, and soil contamination level. Under greenhouse conditions, the seedling of Citrus sp. were treated with *Trichoderma harzianum* and *T. koningii* isolates (TA); suspension

of rhizobacteria - *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescetes* (RS); and association of rhizobacteria with *Trichoderma* isolates (RTA). The seedlings were transplanted to pre-infested substrates with *Phytophthora parasitica* and *P. citrophthora* isolates. The results showed that the treatment RTA controlled the two species of the pathogens. On the other hand, RS controlled only *P. citrophthora*.

Additional keywords: biocontrol, *Trichoderma*, rhizobacteria.

Entre as doenças que atacam os citros, destaca-se a podridão de raízes, causada por *Phytophthora* spp. No passado, essa doença teve pouca importância, pois a laranja azeda (*Citrus aurantium* L.), utilizada como porta-enxerto, era resistente à doença (6). A podridão tornou-se relevante, com o advento da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*) e a inutilização da laranja azeda como porta-enxerto, motivo pelo qual a produção de plântulas de citros com alta qualidade fitossanitária passou a ser fundamental para o controle da doença (5). As práticas recomendadas para o controle da doença em viveiros incluem desde a desinfestação do solo com fumigantes, tratamento de sementes com fungicidas ou tratamento térmico, tratamento da água de irrigação com sulfato de cobre, até a aplicação dos fungicidas fosetyl-al ou metalaxyl (13). Essas medidas são antieconômicas, causam fitotoxidez, induzem o aparecimento de novas raças do patógeno e tem provocado o enfezamento das plântulas (16).

Para reduzir o efeito da aplicação de tais produtos, novas técnicas, como controle biológico com microrganismos antagonistas são alternativas viáveis, com menores riscos de fracasso e de contaminação (8).

Várias espécies de *Trichoderma* já foram relatadas como antagonistas a *Phytophthora*, inclusive *P. parasitica* Dastur. MAY (8) controlou *P. parasitica* pelo cultivo de isolados de *Trichoderma* em farinha de arroz e aplicação em substrato pré-inoculado. AMORIM (1) obteve o controle de *P. parasitica* e *P. citrophthora* (Smith & Smith) Leonian, através da inoculação de plântulas de citros com isolados de *T. harzianum* Rifai e *T. koningii* Oud.

O potencial de rizobactérias antagonistas a esses patógenos, foi comprovado, no Brasil, por AMORIM & MELO (2), ao inocularem plântulas de citros com vários isolados de *Pseudomonas fluorescens* Mig., *P. putida* (Trev.) Mig. e *Bacillus subtilis* Cohn.

A combinação de isolados biocontroladores tem sido sugerida como uma tentativa para aumentar o nível e a consistência do controle de fitopatógenos habitantes do solo, que pode ser 30% mais efetivo do que o tratamento com um único isolado antagonista, possivelmente por aumentar a colonização das raízes ou aumentar a barreira de proteção (7, 10, 9, 11). WELLER & COOK (17) verificaram que a combinação dos isolados 2-79 e 13-79 de *P. fluorescens* promoveu supressão de 50% da podridão do pé do trigo, causada por *Gaeumannomyces graminis* (Sacc) Oliver

& Von Arx var. *tritici* Walker, comparada ao tratamento com o isolado 2-79, que propiciou 25% de controle.

A atividade de biocontrole pode ser aumentada pela combinação de *T. koningii* com *Pseudomonas* spp. fluorescentes. DULLY et al. (4) obtiveram o controle da podridão do pé do trigo com o uso combinado de *T. koningii* e *Pseudomonas* spp. fluorescentes. A atividade combinada dos metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. com compostos antifúngicos produzidos pelos agentes bacterianos pode expandir o "expectrum" de patógenos a serem controlados.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial da associação de isolados de *Trichoderma* spp. com isolados de rizobactérias no tratamento de plântulas de citros para o controle da podridão de raízes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados três isolados de *Trichoderma* (*T₁₃* e *T₉* - *T. harzianum*, e *T₁* - *T. koningii*) e sete isolados de rizobactérias (OG- *Bacillus subtilis*, C1-1B e Sta. Bárbara - *Pseudomonas putida*; C1S/NA, C2-8C e RC2 - *Pseudomonas* fluorescentes, RA2- *P. fluorescens*), procedentes, respectivamente, de iscas de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary e de solos de fazendas dos municípios de Campinas e Guaíra (SP), antagonistas à *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* em plântulas de citros, testados previamente "in vitro" e "in vivo" por AMORIM & MELO (2).

Sementes de limoeiro cravo, oriundas da coleção do Departamento de Horticultura da UNESP-Botucatu-SP., foram pré-germinadas em bandejas contendo solo autoclavado e após germinarem foram transferidas para copos plásticos (500ml) com substrato esterilizado, composto por solo/areia/esterco de boi (2:1:1) inoculado com os isolados de *Phytophthora parasitica* (*P₉*) e *P. citrophthora* (*P₃₈*, *P₄₁* e *P₄₅*), através da técnica de aplicação de suspensão de inóculo no solo (50ml/vaso), obtido a partir do cultivo dos fungos em placas com meio V-8-CaCO₃ (Suco V-8-200 ml, CaCO₃-3g, Ágar-15g, Água destilada-800ml), incubados por dez dias a 28°C, em regime de escuro contínuo, seguido da homogeneização com 200ml de água destilada esterilizada.

Os isolados de *Trichoderma* foram cultivados em BDA (Batata-dextrose-ágar), por 72 horas. Discos de 5mm de diâmetro foram

retirados das bordas de colônias de cada isolado e transferidos para frascos de erlenmeyer (250ml) com 100ml de farinha de arroz úmida e incubados a 28°C sob luz fluorescente, durante sete dias. Após esse período, dois gramas da mistura de *Trichoderma* foram colocados na porção mediana do copo, onde ficaria a maior concentração de radicelas das plântulas.

Para obtenção dos isolados bacterianos, estes foram cultivados em meio NA (Nutriente ágar) por 48 horas, transferidos para placas com o mesmo meio e incubados por 72 horas. Células bacterianas de cada isolado foram suspensas em 4,5ml de solução salina 0,85% e as concentrações ajustadas para 10^5 UFC/ml, aferida em colorímetro, no comprimento de onda de 550 nm, para obtenção do valor de obsorvância. As suspensões foram misturadas e agitadas por dois minutos. As raízes das plântulas foram imersas na suspensão por 30 minutos.

A avaliação foi realizada três meses após o transplante, efetuando-se a medida da altura das plantas, o comprimento das raízes, a matéria seca da parte aérea e da raiz, o número de plantas sobreviventes e a recuperação do patógeno, pelo teste de isca, idealizado por TSAO (15) e adaptado por MAY (8). O método consiste em uma diluição em série do solo infestado, ou seja, uma parte desse solo em duas partes de solo esterilizado, 1:4, 1:8, 1:16 até o ponto máximo de diluição, quando não se recupera mais o patógeno. Pedaços de folhas de citros foram utilizadas como iscas para recuperação de *Phytophthora*: 20 pedaços de folha (3mm²),

30ml de água e 5 gramas de solo para cada diluição. Quanto maior o ponto final de diluição maior o número de propágulos no solo. A presença de esporângios ao redor das iscas foi considerada resposta positiva (+) e a ausência, resposta negativa (-).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em arranjo fatorial, com doze tratamentos, constituídos pelos quatro isolados de *Phytophthora*, e três tipos de inóculo-suspensão de isolados rizobacterianos (SR), associação de isolados de *Trichoderma* (AT) e associação de rizobactérias com isolados de *Trichoderma* (ART), e quatro repetições, sendo cada parcela constituída por nove plântulas. As testemunhas foram inoculadas apenas com os isolados de *Phytophthora*. O mesmo delineamento experimental foi utilizado para o teste de recuperação do patógeno do solo e número de plantas sobreviventes.

Os dados originais da altura de planta, comprimento de raiz, matéria seca da parte aérea e da raiz, número de discos com esporângios e número de plantas sobreviventes foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, conforme PIMENTEL GOMES (12).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância da recuperação do patógeno e número de plantas sobreviventes estão contidos no Quadro 1.

Quadro 1. Recuperação de *Phytophthora* spp. do solo, pelo teste de isca e sobrevivência de plântulas de limoeiro cravo, após três meses de transplantio.

Tratamento ¹	Nº de Discos c/ esporângios ²				Nº de plantas sobreviventes ³			
	P ₄₁	P ₄₅	P ₉	P ₃₈	P ₄₁	P ₄₅	P ₉	P ₃₈
Testemunha	6,0 aC	7,0 aBC	8,0 aAB	9,0 aA	6,0 bA	5,0 cB	4,0 dC	4,0 dC
ART	0,0 bA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 d A	9,0 aA	9,0 aA	9,0 aA	9,0 aA
SR	0,0 bB	0,0 c B	2,0 b A	2,0 cA	9,0 aA	9,0 abA	8,0 bB	8,0 bB
AT	0,0 bC	2,0 bB	3,0 bAB	4,0 ba	9,0 a A	8,0 bB	7,0 cC	7,0 cC

¹ P₄₁, P₄₅, P₃₈ = *P. citrophthora*; P₉ = *P. parasitica*, ART = SR + AT; SR = suspensão de rizobactérias; AT = associação de isolados de *Trichoderma* spp.² Média de quatro repetições (10 discos avaliados). ³ Médias seguidas da mesma letra minúscula, no sentido vertical e médias seguidas da mesma letra maiúscula, no sentido horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

Comparando os resultados do Quadro 1 verifica-se que a associação de isolados rizobacterianos com isolados de *Trichoderma* (ART) destacou-se no controle de *P. parasitica* e *P. citrophthora*, uma vez que proporcionou a sobrevivência total das plântulas e ausência de esporângios no solo, embora não tenha diferido do tratamento com a suspensão de isolados rizobacterianos (SR), em relação aos isolados P₄₁ e P₄₅ de *P. citrophthora*.

As médias da altura de plantas, comprimento de raiz, matéria seca da parte aérea e da raiz (Figura 1) mostraram que o tratamento ART foi o mais significativo, evidenciando maior quantidade de matéria seca da parte aérea e da raiz e altura de plantas em relação às testemunhas, excetuando-se o isolado P₄₅ e P₃₈ (*P. citrophthora*). Esses resultados revelam a possibilidade do uso de diferentes espécies, ou seja da interação microbiana, no controle de patógenos de raízes, tão questionada por fitopatologistas, mas tão pouco estudada, como observaram BOWEN & ROVIRA (3).

O uso combinado de isolados é uma tentativa, proposta por alguns pesquisadores, para melhorar o desempenho de um

tratamento de controle biológico. PIERSON & WELLER (11) sugeriram que a mistura de isolados, comparada ao uso de um único antagônico, pode resultar em uma comunidade da rizosfera mais estável, ampliando a diversidade de mecanismos de controle biológico, podendo suprimir vários patógenos. DULLY et al. (4), estudando a combinação de *T. koningii* com *Pseudomonas* spp. fluorescentes para o controle da podridão do pé do trigo, constataram a compatibilidade desses agentes quando aplicados simultaneamente. Nenhum dos isolados testados, nem a mistura dos isolados, reduziu a ação antagônica de *T. koningii*; alguns isolados até melhoraram a atividade do fungo. O desempenho de todos os tratamentos bacterianos foi gradualmente melhorado pela combinação com *T. koningii*.

Possivelmente, o aumento da atividade de biocontrole exercido pela combinação de *Trichoderma* spp. com *Pseudomonas* spp. fluorescentes se deva ao sítio de atuação das espécies que interagem na rizosfera. De acordo com Cramer & May (1972), citados por BOWEN & ROVIRA (3), interações de espécies são

pontos chaves na consideração da população biológica da rizosfera. Microbiologistas tendem a considerar os organismos que coexistem sobre uma raiz como ocupantes de diferentes nichos, mas esses diferentes organismos podem estar ocupando o mesmo nicho, sítios vizinhos com propriedades idênticas ou diferentes partes da raiz.

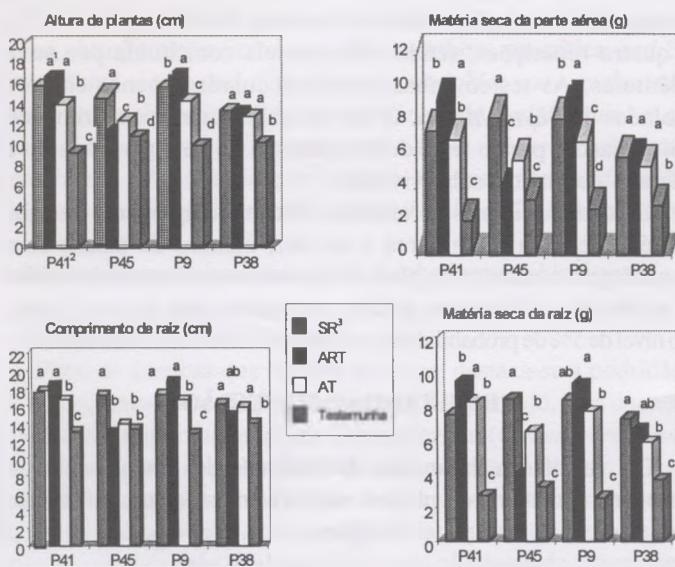


Figura 1 - Desenvolvimento de plântulas de limoeiro cravo em substrato infestado com isolados de *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* e com associação de antagonistas. ¹Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). ²P₄₁, P₄₅, P₃₈ = *Phytophthora citrophthora*, P₉ = *Phytophthora parasitica*. ³ART = SR + AT; SR = suspensão de rizobactérias; AT = associação de isolados de *Trichoderma* spp..

SUSLOW (14) cita que o posicionamento adequado do organismo antagonista é um importante mecanismo de antagonismo. Certas áreas da raiz, tais como junções de células, pontos de emergência de raízes laterais, ápice, etc. são favoráveis à colonização de muitos tipos de bactérias e fungos, devido à abundância de exsudatos de raízes (18).

O sucesso do presente trabalho, provavelmente, se deve à associação dos fatores citados acima, ou seja, aos diferentes sítios de colonização que os isolados bacterianos e os isolados de *Trichoderma* desenvolveram sobre o hospedeiro, atraídos pelos exsudatos liberados pelas suas raízes.

LITERATURA CITADA

01.AMORIM, E.P. da R. Controle Biológico de *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica* Dastur e *Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith) Leonian em plântulas de citros. Botucatu, 1997. 111p. Tese (Doutorado) - Faculdade de

- Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.
- 02.AMORIM, E.P. da R., MELO, I.S. Controle biológico de *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica* Dastur e *Phytophthora citrophthora* (Smith of Smith) Leonian com rizobactérias. *Fitopatologia*, Brasília, v.22, p. 243, 1997.
- 03.BOWEN, G.D., ROVIRA, A.D. Microbial colonization of plant roots. *Annual Review Phytopathology*, Palo Alto, v.14, p. 121-144, 1976.
- 04.DULLY, B.R., SIMON, A., WELLER, D.M. Combination of *Trichoderma Koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. *Phytopathology*, St. Paul, v.86, p. 188-194, 1996.
- 05.FEICHTENBERGER, E. Gomose dos citros. São Paulo: Instituto Biológico, 1986. 14 p.
- 06.KIMATI, H., GALLI, F. Doenças dos citros. In: GALLI, F. (Coord.) *Manual de fitopatologia, doenças de plantas cultivadas*. 2 ed. São Paulo: Ceres, 1980. p. 213-235.
- 07.LEMANCEAU, P., ALABOUVETTE, C. Biological control of *Fusarium* diseases by *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop protection*, Guildford, v.10, p. 279-286, 1991.
- 08.MAY, L.L. Controle biológico, físico e químico de *Phytophthora parasitica* Dastur em plântulas de citros. Piracicaba, 1994. 89p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- 09.PAULITZ, T.C., AHMAD, J.S., BAKER, R. Integration of *Pythium nunn* and *Trichoderma harzianum* isolate T-95 for the biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. *Plant Soil*, Dordrecht, v. 121, p. 243-250, 1990.
- 10.PARK, C.S., PAULITZ, T.C., BAKER, R. Biocontrol of *Fusarium* wilt cucumber resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and nonpathogenic isolates of *F. oxysporum*. *Phytopathology*, St. Paul, v.78, n. 2, p. 190-194, 1988.
- 11.PIERSON, E.A., WELLER, D.M. Use of mixture of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathology*, St. Paul, v. 84, p. 940-947, 1994.
- 12.PIMENTEL GOMES, F. *Curso de Estatística Experimental*. Piracicaba: Nobel, 1985. 466 p.
- 13.ROSSETTI, V. Doenças dos citros. São Paulo: Fundação Cargil, 1981. p.671-673.
- 14.SUSLOW, T. Role of root-colonizing bacteria in plant growth. In: MOUNT, M.S., LACY, G.L. *Phytopathogenic Prokaryotes*. New York: Academic Press, 1982. p. 187-223.
- 15.TSAO, P.H. A serial dilution med-point method for estimating disease potentials of citrus *Phytophthoras* in soil. *Phytopathology*, St. Paul, v.50, p. 714-724, 1960.
- 16.TUCKER, C.P.H., ANDERSON, C.A. Correction of citrus seedlings stunting on fumigated soil by phosphate application. *Proceedings of the Florida State Horticulture Society*, Winter Haven, v.85, p.10-12, 1972.
- 17.WELLER, D.M., COOK, R.J. Supression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, St. Paul, v.73, n.3, p. 463-469, 1983.
- 18.WELLS, H.D. *Trichoderma* as a biocontrol agent. In: MUKERJI, K.G., GARG, K.L. *Biocontrol of plant disease*. Boca Raton: CRC Press, 1988. v.1, p. 71-82.